

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

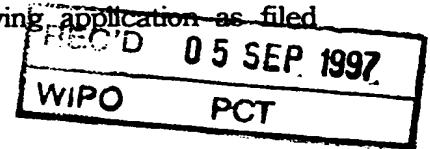
20.08.97

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.



出 願 年 月 日

Date of Application:

1996年 7月17日

出 願 番 号

Application Number:

平成 8年特許願第187945号

出 願 人

Applicant (s):

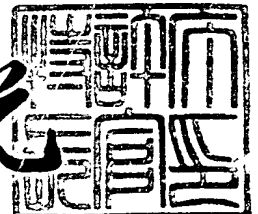
鐘淵化学工業株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1997年 5月30日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

荒井 寿光



出証番号 出証特平09-3040762

【書類名】 特許願

【整理番号】 H052101

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願

【提出日】 平成 8年 7月17日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 31/00

【発明の名称】 自己免疫疾患および炎症性疾患診断薬

【請求項の数】 9

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市右京区西院月双町111-116

 【氏名】 尾▲さき▼ 承一

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府枚方市伊加賀西町79-40-506号

 【氏名】 傍島 淳子

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市左京区岩倉下在地町211-2 ベルヴェ宝ヶ池105号

 【氏名】 岡崎 貴裕

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市左京区松ヶ崎修理式町1 うるしの館小兵衛2-C

 【氏名】 上▲すぎ▼ 裕子

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市中京区三条通柳馬場東入ル中之町9 グランデアサイ13-B

 【氏名】 田中 真生

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市西京区大枝北沓掛町4-1-2

【氏名】 中尾 一和

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県姫路市日出町 2 - 1 9 - 2 朝日プラザ姫路東 3
0 5

【氏名】 小坂田 史雄

【特許出願人】

【識別番号】 000000941

【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社

【代表者】 古田 武

【代理人】

【識別番号】 100078282

【弁理士】

【氏名又は名称】 山本 秀策

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成 7年特許願第261895号

【出願日】 平成 7年10月 9日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001878

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 新規性の喪失の例外証明書提出書 1

【援用の表示】 変更を要しない為省略する

【包括委任状番号】 9407889

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 自己免疫疾患および炎症性疾患診断薬

【特許請求の範囲】

【請求項1】 HMG-1ファミリーから選ばれるポリペプチド、HMG-2ファミリーから選ばれるポリペプチド、あるいはそれらの断片であって自己免疫疾患および／または炎症性疾患患者の抗体と反応し得る断片の少なくとも一種を含有する、自己免疫疾患および／または炎症性疾患の診断薬。

【請求項2】 前記自己免疫疾患が潰瘍性大腸炎である、請求項1に記載の診断薬。

【請求項3】 前記ポリペプチドが、ヒト、ウシ、ブタ、チキン、マウス、ラットのHMG-1またはHMG-2から選択される、請求項2に記載の診断薬。

【請求項4】 HMG-1ファミリーから選ばれるポリペプチド、HMG-2ファミリーから選ばれるポリペプチド、あるいはそれらの断片であって自己免疫疾患および／または炎症性疾患患者の抗体と反応し得る断片の少なくとも一種を含有する、自己免疫疾患および／または炎症性疾患を診断するためのキット。

【請求項5】 前記自己免疫疾患が潰瘍性大腸炎である、請求項4に記載のキット。

【請求項6】 前記ポリペプチドが、ヒト、ウシ、ブタ、チキン、マウス、ラットのHMG-1またはHMG-2から選択される、請求項5に記載のキット。

【請求項7】 自己免疫疾患および／または炎症性疾患患者の抗体を検出する方法であって、該方法はHMG-1ファミリーから選ばれるポリペプチド、HMG-2ファミリーから選ばれるポリペプチド、あるいはそれらの断片であって自己免疫疾患および／または炎症性疾患患者の抗体と反応し得る断片の少なくとも一種を含有する試薬と、自己免疫疾患および／または炎症性疾患患者の体液成分とを反応させる工程を含む方法。

【請求項8】 前記自己免疫疾患が潰瘍性大腸炎である、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 前記ポリペプチドが、ヒト、ウシ、ブタ、チキン、マウス、ラットのHMG-1またはHMG-2から選択される、請求項8に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は自己免疫疾患患者、炎症性疾患患者の抗体が反応するHMG-1、HMG-2、あるいはそれらの断片ポリペプチドを用いる自己免疫疾患あるいは炎症性疾患の診断薬あるいは診断のためのキット、および自己免疫疾患患者あるいは炎症性疾患患者の抗体を検出する方法に関する。特に、潰瘍性大腸炎患者の抗体が反応するHMG-1、HMG-2、あるいはそれらの断片ポリペプチドを用いる潰瘍性大腸炎の診断薬あるいは診断のためのキット、および潰瘍性大腸炎患者の抗体を検出する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

炎症性の疾患、特に炎症性腸疾患には、種々の抗好中球細胞質抗体（ANCA）が存在することが報告されている。ANCAは間接蛍光抗体法（IIF）により検出された自己抗体であり、その染色パターンによりサイトプラスミック-ANCA（C-ANCA）とペリヌクレア-ANCA（P-ANCA）に区別される。C-ANCAはWegener肉芽腫症に高頻度で検出され、その抗原はプロテイナーゼ-3（proteinase-3、以下PR-3と省略する）である。他方、P-ANCAは顕微鏡的多発性動脈炎（microscopic polyarteritis）、pauci-immune型壊死性半月体形成性腎炎（necrotizing crescentic glomerulonephritis、NCGN）に高頻度で検出され、その抗原はミエロパーオキシダーゼ（myeloperoxidase：MPO-ANCA）であると同定された。その後、PR-3に比べて疾患特異性は低い、MPO-ANCAは毛細血管および細小血管の血管炎症症候群の一つである壊死性血管炎を示す病態に高頻度で検出されることがわかった。従って、血管炎症候群の早期診断や鑑別診断には、ANCAが重要な役割を果たしている。つまり、ANCA陽性か否か、そして陽性の場合にはそのサブセットが何かを決定することにより、血管炎症候群の早期診断や鑑別診断が可能となる。

【0003】

最近、潰瘍性大腸炎（UC）等の慢性炎症性腸疾患（inflammatory bowel disease、IBD）、慢性関節リウマチ（RA）、全身性エリテマトーデス（SLE）、自己免

疫性肝炎（AIH）、悪性腫瘍、アメーバ膿瘍、スウィート病等の炎症性の諸疾患の患者にP-ANCAが認められている。P-ANCAの抗原としてラクトフェリン、カテプシンG、エラスターゼ、リゾチーム等が同定され、病因や病態との関連が研究されている。しかしながら、これら抗原のP-ANCAに対する特異性は低く、他の抗原が存在することが示唆されている。

【0004】

炎症性腸疾患（inflammatory bowel disease）である潰瘍性大腸炎（UC）およびクローン病（CD）においては蛍光抗体間接法（IIF）でこれらの抗好中球細胞質抗体（ANCA）が検出される割合（陽性率）はそれぞれ、40～87%および6～27%とされている。その染色パターンは潰瘍性大腸炎（UC）ではP-ANCAが80～95%を占めるのに対して、クローン病（CD）ではP-ANCAおよびC-ANCAが均等に検出されている。

【0005】

潰瘍性大腸炎（UC）およびクローン病（CD）で検出されるANCAに対応する抗原としてはラクトフェリン（Lactoferrin）、カテプシンG（cathepsinG）、ミエロパーオキシデース（myeloperoxidase）およびミエロパーオキシデース+エラスターゼ、ミエロパーオキシデース+エラスターゼ+カテプシンG等種々の報告がされているが、これらの疾患に特異的に対応する抗原は、未だ決定されていないのが現状である。

【0006】

潰瘍性大腸炎（UC）の臨床上の標準的な診断には、内視鏡検査、バイオプシー、X線検査がある。これらの検査は患者にとっては、費用が高く、苦痛を伴い、また拘束される時間が長いという欠点がある。他方で、血清学的診断として間接蛍光抗体法（IIF）が用いられている。しかし、この方法は、感度が高くないうえ、バックグラウンドが高くなる傾向にある、さらに、好中球あるいは他の細胞をプレートにエタノールで固定化して用いるため細胞の状態や固定化技術により結果が信頼できないものとなるという欠点を有している。以上のように、患者血清を用いる特異的で簡便な潰瘍性大腸炎（UC）の診断方法が開発されていないのが現状である。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

従って、自己免疫疾患患者、炎症性疾患患者の抗原を特定することは、自己免疫疾患、炎症性疾患の診断を容易にし、治療にも道を開くものである。特に、潰瘍性大腸炎における抗好中球細胞質抗体（ANCA）に対応する抗原を特定することは、潰瘍性大腸炎の診断を容易にし、治療にも道を開くものである。そこで、自己免疫疾患、炎症性疾患、特に潰瘍性大腸炎の抗体に特異的な抗原を単離すること、およびこの抗原を用いた簡便な抗体の検出方法の開発が望まれている。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本願発明者らは、上記の従来の問題点を克服するため鋭意研究を重ねた結果、自己免疫疾患および炎症性疾患患者、特に潰瘍性大腸炎患者の抗体が反応する新規な抗原として、既知の蛋白質である high mobility group protein-1 (HMG-1) および high mobility group protein-2 (HMG-2) を単離同定することに成功した。この抗原を用いることにより、当該抗原に対する抗体の検出が潰瘍性大腸炎のマーカーになりうることを見だし、本願発明を完成させるに至った。

【0009】

本願発明は、HMG-1ファミリーから選ばれるポリペプチド、HMG-2ファミリーから選ばれるポリペプチド、あるいはそれらの断片であって自己免疫疾患および／または炎症性疾患患者の抗体と反応し得る断片の少なくとも一種を含有する、自己免疫疾患および／または炎症性疾患の診断薬、これらの疾患を診断するためのキット、および自己免疫疾患および／または炎症性疾患患者の抗体を検出する方法に関する。

【0010】

好適な実施態様においては、前記自己免疫疾患が潰瘍性大腸炎である。

【0011】

好適な実施態様においては、前記ポリペプチドが、ヒト、ウシ、ブタ、チキン、マウス、ラットのHMG-1またはHMG-2から選択される。

【 0 0 1 2 】

このことにより、本願発明の目的が達成される。

【 0 0 1 3 】

【発明の実施の形態】

本願発明に用いられるポリペプチドは、HMG-1ファミリーあるいはHMG-2ファミリーに含まれるポリペプチド、あるいはこれらの断片から選ばれる。

【 0 0 1 4 】

HMG-1 (high mobility group protein-1) ファミリーとは、配列番号 1 に示されるヒトHMG-1と 90%あるいはそれ以上のアミノ酸相同性を有するポリペプチドをいい、例えば、ウシHMG-1 (配列番号 3)、ブタ (配列番号 4)、ラット (配列番号 5) などのHMG-1を含む。好ましくはヒトHMG-1であり、市販のウシHMG-1も使用され得る。これらのHMG-1のアミノ酸配列の比較を図 9 に示す。

【 0 0 1 5 】

他方、HMG-2 (high mobility group protein-2) ファミリーとは、配列番号 2 に示されるヒトHMG-2と 80%あるいはそれ以上のアミノ酸相同性を有するポリペプチドをいい、ブタHMG-2 (配列番号 6)、ウシHMG-2の部分配列 (配列番号 7)、チキンHMG-2 (配列番号 8)、チキンHMG-2a (配列番号 9)、マウスHMG-2 (配列番号 10) などのHMG-2を含む。好ましくはヒトHMG-2であり、市販のウシHMG-2も使用され得る。これらのHMG-2のアミノ酸配列の比較を図 9 に示す。

【 0 0 1 6 】

HMG-1 あるいはHMG-2ファミリーに属するポリペプチドには、アミノ酸が一つまたはそれ以上、欠失、置換、あるいは付加されたポリペプチドあるいは、それらの断片であって、自己免疫疾患および／または炎症性疾患患者の抗体と反応し得るポリペプチドも含まれる。

【 0 0 1 7 】

これらの断片とは、HMG-1ファミリーまたはHMG-2ファミリーに属するポリペプチドの断片のうち、自己免疫疾患および／または炎症性疾患患者の抗体と反応し得る断片をいう。断片は、適当な蛋白分解酵素を用いて作製され得る。作製された断片が抗体と反応するか否かは、自己免疫疾患あるいは炎症性疾患患者から得

られた血清と反応させることにより、決定し得る。この方法は当業者には周知であり、下記の抗体の検出方法と同じ手法が用いられ得る。

【0018】

HMG-1 およびHMG-2 は、あらゆる細胞が持っている普遍的な蛋白質であるためいかなる臓器、組織、細胞からでも抽出することにより調製できる。例えばヒト胸腺、ブタ胸腺、ウシ胸腺、ヒト胎盤、好中球、HL-60細胞株等である。

【0019】

上記のHMG-1ファミリーまたはHMG-2ファミリーに属するポリペプチドは、それを生産する上記細胞を培養することにより、あるいはそのポリペプチドをコードする遺伝子を組み込んだベクターを宿主細胞に導入して発現させることにより、生産され得る。アミノ酸が一またはそれ以上、欠失、置換、あるいは付加されたポリペプチドは、例えば、HMG-1またはHMG-2の遺伝子配列をもとに、周知の方法、例えば、部位特異的突然変異、M13ファージを用いる欠失突然変異などの方法で遺伝子配列を改変して、これを発現させることにより生産され得る。宿主細胞としては、原核生物、真核生物のいずれもが用いられ得る。例えば、大腸菌、バシラスなどの細菌、酵母、カビ、昆虫細胞、哺乳動物細胞などが挙げられる。ポリペプチドの精製には、公知の方法、例えば、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相液体クロマトグラフィー等のクロマトグラフィーを単独で、あるいは組み合わせて用いて、精製され得る。好適には逆相HPLCが用いられ得る。逆相HPLC用カラムとしては、市販の種々のカラムが用いられ得るが、好適には蛋白質分離用カラム、例えば、YMC-プロテインRPカラム（ワイエムシー社製）が用いられ得る。

【0020】

本願発明において、自己免疫疾患として潰瘍性大腸炎が挙げられる。本願発明でいう潰瘍性大腸炎とは、以下の症状を有するものをいう。まず、潰瘍性大腸炎とは、主として粘膜と粘膜下層を侵す、大腸特に直腸の特発性、非特異性の炎症性疾患をいう。この疾患は、30歳以下の成人に多いが、小児や50歳以上のものにも見られる。原因は不明で、免疫的機序や遺伝因子、心理学的要因の関与が考えられている。通常血便下痢と種々の全身症状を示す。長期にわたり、かつ大腸全

体をおかす場合には悪性化の傾向がある。難治性の潰瘍性大腸炎とは、上記潰瘍性大腸炎が、厳密な内科的治療下でありながら、①慢性持続性、②再燃後の6ヶ月間以上なお活動期にある、③頻回に再燃を繰り返す、のいずれかの条件を満たす症例をいう。

【0021】

抗体とは、自己免疫疾患あるいは炎症性疾患患者の体液中に存在し、ある特定の抗原性の物質により惹起される、体液に含まれる成分をいう。特に、難治性潰瘍性大腸炎患者の抗体、あるいは潰瘍性大腸炎患者の抗体というときは、それぞれ難治性潰瘍性大腸炎あるいは潰瘍性大腸炎と診断された患者の血清などの体液に含まれる体液成分をいう。潰瘍性大腸炎患者の抗体としては、IgM、IgG、IgE、IgD、IgA等が挙げられる。

【0022】

本願発明の診断薬は、上記のHMG-1ファミリーあるいはHMG-2ファミリーに含まれるポリペプチド、あるいはこれらの断片を含む。診断薬には、HMG-1ファミリーのポリペプチド、HMG-2ファミリーのポリペプチドあるいはその断片が少なくとも一種類含まれていればよい。好適にはHMG-1およびHMG-2の混合物の使用である。

【0023】

この診断薬は、自己免疫疾患患者の抗体と反応し、抗原抗体複合体を形成する。従って、形成した抗原抗体複合体を検出し得るさらなる成分を含有し得る。これらの成分は、たとえば、沈降反応法、ELISA法、RIA法、ウェスタンブロッティング法等の方法に適合する成分である。

【0024】

HMG-1ファミリーあるいはHMG-2ファミリーに含まれるポリペプチド、あるいはこれらの断片は、診断キットにされ得る。診断キットは、例えば、HMG-1ファミリーあるいはHMG-2ファミリーに含まれるポリペプチド、あるいはこれらの断片が固定化されたELISA用プレートと、自己免疫疾患患者の抗体と結合した抗原抗体複合体を検出するために試薬とを含み得る。この試薬は、沈降反応法、ELISA法、RIA法、ウェスタンブロッティング法等の方法に適合する成分を含む。検出

するための試薬としては、ELISA法では、例えば2次抗体試薬が挙げられる。2次抗体試薬は、一般に免疫測定法で用いられる標識剤で標識されていればよい。そのような標識剤としては、放射性同位体（例えば ^{32}P 、 ^3H 、 ^{125}I 等）、酵素（例えば β -ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、モノアミノオキシダーゼなど）、補酵素・補欠分子族（例えば、FAD、FMN、ATP、ビオチン、ヘムなど）、フルオレセイン誘導体（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、フルオレセインチオフルバミルなど）、ローダミン誘導体（例えば、テトラメチルローダミンBイソチオシアネートなど）、ウムベリフェロンおよび1-アニリノ-8-ナフタレンスルホン酸、ルミノール誘導体（例えば、ルミノール、イソルミノールなど）などが用いられ得る。

【0025】

キットの形態としては、抗原が適切な容器、樹脂、膜、フィルム等に含まれている形態、あるいは、抗原が、容器、樹脂、膜、フィルム等の担体に固定された形態などが挙げられる。担体と抗原の結合は、物理的吸着法、イオン結合法、共有結合法、包括法など公知の方法を採用し得、とりわけ、物理的吸着法は簡便である点で好ましい。抗原と担体とは直接、あるいは抗原と担体との間に他の物質（スペーサー）などを介して結合され得る。固定された抗原は、ゼラチン、BSAなどのブロッキング剤で、非特異的結合を抑制するためにブロッキング処理され得る。

【0026】

本願発明の自己免疫疾患あるいは潰瘍性大腸炎患者の抗体を検出する方法は、HMG-1ファミリーから選ばれるポリペプチド、HMG-2ファミリーから選ばれるポリペプチド、あるいはそれらの断片（抗原）と自己免疫疾患あるいは炎症性疾患患者の体液成分とを反応させる工程を含む方法である。抗原と抗体とを反応させる条件は、当業者に周知の条件が適用される。抗原抗体反応物の検出も、当業者に公知の方法が適用され得る。検出方法としては、沈降反応法、ELISA法、RIA法、ウェスタンブロッティング法等が挙げられる。例えば、適当に希釈された患者血清と抗原とを反応させ、洗浄後、2次抗体であるアルカリフォスファターゼ標識

した抗ヒトIgG抗体を加えて反応させ、その後、アルカリフォスファターゼ基質であるp-ニトロフェニルリン酸を加えて発色させ、405nmの吸光度を測定することにより抗HMG-1および抗HMG-2抗体が測定され得る。

【0027】

以下、潰瘍性大腸炎患者を例にとり、その抗体と反応する抗原をスクリーニングし、その抗原がHMG-1およびHMG-2であることを特定する方法を説明する。

【0028】

まず、潰瘍性大腸炎患者から血液を採取し、血清成分を得る。次に、その血清成分について抗好中球細胞質抗体（ANCA）の存在を蛍光抗体法で測定する。他方で、健常人の末梢血より比重遠沈法により好中球画分を分離する。次に、この好中球画分を処理して、好中球ライセートを得、ウェスタンブロッティングを行う。例えば、 10^6 個に相当する好中球を2-メルカプトエタノールおよびSDSを含むサンプルバッファーで溶解し、10分間煮沸し、アイスコールドで急冷後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行う。泳動後、常法に従って、ナイロン膜に蛋白質のバンドをトランスファーし、スキムミルク等を用いて非特異的結合をブロックする。

【0029】

他方、ANCA陽性患者の血清をプロテインAカラムに通し、IgG抗体画分を精製する。この精製されたIgG抗体画分と上記ナイロン膜に転写された好中球ライセートを反応させる。ナイロン膜を洗浄後、例えば、ECLキット（アマシャム社製）などの検出剤で化学発光させ、バンドを検出し、抗原の存在が決定される。他の病気、例えば、クローン病との交差性を検討し、特異性が確認される。

【0030】

上記記載の方法により、抗原性を有するポリペプチド（抗原ペプチド）が確認され得る。このような抗原ポリペプチドは、公知の蛋白質の精製方法を適用して、精製され得る。

【0031】

あるいは、上記抗体を用いて、抗原ペプチドを生産する細胞株が特定され得る。このような細胞株を用いて抗原ペプチドを生産させ、公知の蛋白質の精製方法

を適用して、精製され得る。

【0032】

上記記載の方法を用いることにより、28kDaの、抗好中球細胞質抗体に対する抗原が特定され得た。後に実施例で示すように、ANCA陽性患者24人中10人に28/39.5/44/47/58kDaの抗原が検出され、この7人中5人が難治性の潰瘍性大腸炎と診断されていた。他方、IIFでANCA陰性の潰瘍性大腸炎患者血清では陽性バンドは検出されなかった。なお、本願発明における抗原の分子量は、10%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で決定したものをいう。

【0033】

上記スクリーニング方法で、28kDa抗原を産生する細胞をスクリーニングしたところ前骨髄性白血病由来の好中球細胞であるHL-60細胞株(ATCC CCL-240)が28kDa抗原を持つことがわかり、さらに、28kDa抗原に加えて29kDa抗原をも産生することが見いだされた。このHL-60細胞株から、28kDa抗原および29kDa抗原が精製され得る。28kDa抗原および29kDa抗原の精製には、公知の蛋白質の精製方法が適用され得る。例えば、HL-60細胞株を、5%FCSを添加したRPMI1640培地で培養し、細胞を6M塩酸グアニジンに溶解し、超音波処理を行うことにより蛋白分解酵素を失活させる。完全に蛋白質を溶解させ、透析、例えば限外濾過により、濃縮すると同時に溶液をPBSに置換する。この水溶液から、28kDa抗原および29kDa抗原が精製され得る。好適には逆相HPLCが用いられ得る。アセトニトリルの濃度勾配を用いる逆相HPLCで分画することにより90%以上の純度を有する28kDa抗原および29kDa抗原が精製され得る。アセトニトリルの濃度勾配を用いる逆相HPLCの条件は当業者には周知の条件で行われ得る。

【0034】

精製された蛋白質のアミノ酸配列の解析の結果、29kDa抗原はhigh-mobility group protein-1 (HMG-1)、および28kDa抗原は high-mobility group protein-2 (HMG-2) と同定された。

【0035】

この29kDa抗原および28kDa抗原は潰瘍性大腸炎患者の抗体と用量依存的に反応した。市販のウシのHMG-1およびHMG-2(和光純薬(株)製)も、潰瘍性大腸炎患者

の抗体と反応した。従って、HMG-1およびHMG-2ファミリーは、潰瘍性大腸炎患者の抗原であると考えられる。

【0036】

潰瘍性大腸炎を有すると考えられる患者の末梢血リンパ球とHMG-1 およびHMG-2との応答性を調べることにより、疾患特異性を検定することができる。すなわち、HMG-1 およびHMG-2あるいは免疫反応性のあるそれらの合成ペプチドに应答してTリンパ球が増殖するかどうかを測定することにより疾患を検出し得る。

【0037】

P-ANCAの対応する抗原としてHMG-1 およびHMG-2 が同定されたため、これらに対する抗体は潰瘍性大腸炎以外のP-ANCA陽性疾患にも検出される可能性がある。さらには間接蛍光抗体法よりもELISA法の方が感度が高いため、今までANCA陰性あるいは陽性率が低いと考えられていた疾患にも抗HMG-1 抗体および抗HMG-2 抗体が検出される可能性がある。例えば、ANCA陽性疾患を含む自己免疫疾患や炎症性疾患例えば、潰瘍性大腸炎、クローン病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、自己免疫性肝炎、B型肝炎、C型肝炎、ウェゲネナー肉芽腫症、白血球破壊性血管炎、半月体形成性腎炎、pauci-immune型壊死性半月体形成性腎炎（急速進行性腎炎）、顕微鏡的多発性動脈炎、Churg-Strauss症候群、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、ベーチェット病、多発性筋炎、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、進行性全身性硬化症（強皮症）、混合性結合組織病、が挙げられる。

【0038】

以下、本発明を実施例を挙げて説明する。

【0039】

【実施例】

（実施例1） 好中球細胞質抗体（ANCA）の間接蛍光抗体法（IIF）による検出
潰瘍性大腸炎患者35人（男16人、女19人）から末梢血を採取し、遠心分離（4℃、13分間、2000rpm）して血清成分を得た。この血清について抗好中球細胞質抗体（ANCA）の陽性率を間接蛍光抗体法で測定した。対照としてクローン病患者10人（男9人、女1人）から採取した血液を同様に処理して得た血清成分につい

ても測定した。

【0040】

エタノール固定したヒト好中球を用いた間接蛍光抗体法の測定条件を以下に記載する。

【0041】

まず、末梢血をフィコールパックを用いる比重遠沈法にかけて好中球を分離し、サイトスピンにより、1スライドあたり 10^5 個貼付する。これをドライヤーの冷風で風乾し、PBS (0.8% NaCl 0.02% KCl/10mM Na_2HPO_4 /1.5mM KH_2PO_4 pH7.4) で洗浄する。他方で、サンプルの血清をPBSで1:10に希釈し、その20 μ lを上記プレートにのせ、湿潤室で、室温で1時間反応させる。反応終了後、PBSで洗浄する。FITC標識ウサギ抗ヒトIgG (Fab') 2抗体をPBSで1:20に希釈し、その20 μ lを上記プレートに乗せ、湿潤室で、室温で30分間反応させる。反応終了後、PBSで洗浄する。洗浄後、PBSで1:9に希釈したグリセロールで包埋し、蛍光顕微鏡で観察する。この方法で検出した結果を表1に示した。潰瘍性大腸炎患者35人中、24人がANCAを有していた(陽性率は69%:表1参照)

この陽性患者24人の血清成分中の抗好中球細胞質抗体(ANCA)は、蛍光抗体間接法(IIF)の染色パターンとしてはほとんどがP-ANCA(24人中22人がP-ANCA、2人がヌクレア-ANCA)であった(表1参照)。後記する表3の患者No.24および25の2人がヌクレア-ANCAであった。

【0042】

【表1】

潰瘍性大腸炎患者およびクローン症患者のIIFによるANCA

患者	患者数	陽性者 陽性率(%)	染色パターン			titre
			ペリヌクレア	サイトプラスミック	ヌクレア	
潰瘍性大腸炎	35	24(59)	22	0	2	1/10-1/320
クローン症	10	6(50)	2	4	0	1/10-1/40
正常	39	0(0)				

【0043】

(実施例2) ANCAに対する既知抗原の検討

上記、潰瘍性大腸炎患者35人について、ANCAに対する抗原を検討した。

【0044】

ミエロパーオキシデース (MPO) $5\mu\text{g/ml}$ 、カテプシンG (CaG) $5\mu\text{g/ml}$ 、およびラクトフェリン (LF) $10\mu\text{g/ml}$ を調製し、96穴のマイクロタイタープレートにそれぞれ $50\mu\text{l/well}$ 、 $50\mu\text{l/well}$ および $100\mu\text{l/well}$ 注入し、 4°C で1夜、コーティングした。コーティング後、溶液を除去し、5%BSA (ウシ胎仔血清) を含むPBS (5%BSA/PBS) を加え、30分間反応させた。ついで、5%BSA/PBSを除去し、患者から得られた血清を5%BSA/PBSを用いて10倍に希釈し、マイクロタイタープレートに加え、室温で24時間反応させた。反応液を除去し、1%BSA/PBS/0.5%Tween20で5回洗浄した。洗浄後アルカリフォスファターゼ (ALP) 標識ヒツジ抗ヒトIgG抗体を5%BSA/PBSで1000倍に希釈して加え、室温で24時間反応させた。反応終了後、1%BSA/0.5%Tween20/PBSで5回洗浄した。洗浄後、p-ニトロフェニルリン酸 (最終濃度 5mg/ml) の10%ジエタノールアミン溶液 (ジエタノールアミン 50ml +蒸留水 450ml) を $100\mu\text{l}$ 加え、室温で30分間発色させた。発色後、 405nm の吸光度を測定した。

【0045】

この方法で、抗ミエロパーオキシデース抗体は、前例で検出できず、IIF陽性患者24人のうち、抗カテプシンG抗体については9人が陽性であり、抗ラクトフェリンについては3人が陽性であった。他の12人は対応する抗原を特定することはできなかった (後述の表2および表3参照)。

【0046】

(実施例3) 抗好中球細胞質抗体 (ANCA) に対する抗原のスクリーニング

抗好中球細胞質抗体 (ANCA) の陽性患者24人について、好中球ライセートを用いたウエスタンブロッティングをおこなった。

【0047】

患者から末梢血を採取し、フィコールパックを用いる遠心分離法で、好中球画分を調製した。1ウェルあたりPBS $8\mu\text{l}$ に好中球を 10^6 個浮遊させ、25%2-メル

カプトエタノール、10% SDSを含むサンプルバッファー (0.2M Tris-HCl pH6.8/10% SDS/25% 2-メルカプトエタノール/25%グリセロール/0.01% BPB)を2 μ l加えて直ちに10分間煮沸して抗原溶液とした。この抗原溶液を、SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いる電気泳動をおこなった。泳動後、常法に従い、ナイロン膜にトランスファーし、非特異的結合をブロックするために5%スキムミルク溶液を加えて2時間反応させた。他方、患者血清320 μ lをプロセップA (10mlベッドボリューム) にかけて、0.1M-グリシン (pH3.0) を用いてIgG画分を溶出し、精製し、IgG 20mg/mlの溶液を得た。上記調製したナイロン膜とIgG溶液1mlとを5%スキムミルクで8倍希釈して4℃で一晩反応させた。洗浄後、ペロキシダーゼ結合抗ヒトIgG抗体13 μ g/mlをさらに反応させ、ECLキット (アマシャム社製) で化学発光させ、バンドを検出した。結果を表2および表3に示す。

【0048】

【表2】

患者No.	IIF	MPO	CaG	LF	28KDa抗原等	難治性
1	+	-	-	-	+	+
2	+	-	-	+	-	-
3	+	-	-	-	-	-
4	+	-	+	-	+	+
5	+	-	-	-	-	-
6	+	-	+	-	+	+
7	+	-	-	+	-	-
8	+	-	+	-	+(39.5KDa)	+
9	+	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-
11	+	-	-	-	+(47KDa)	-
12	+	-	-	-	-	-
13	+	-	-	-	-	-
14	+	-	+	-	+	-
15	+	-	-	-	+(44KDa)	-
16	+	-	-	-	-	-
17	+	-	+	-	+	+
18	+	-	-	-	-	-
19	+	-	-	-	-	-
20	+	-	+	-	+	-

表中+は反応性あり、また難治性であることを示す

【0049】

【表3】

患者No.	IIF	MPO	CaG	LF	28KDa抗原等	難治性
21	+	-	+	-	+	+
22	+	-	-	+	-	+
23	-	-	+	-	-	-
24	+	-	+	-	+(50KDa)	-
25	+	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-

表中+は反応性あり、および難治性であることを示す

【0050】

これらの結果、抗好中球細胞質抗体（ANCA）の陽性患者24人中11人の血清中に、28/39.5/44/47/50/58kDaのバンドのいずれかと結合する抗原が存在することが見いだされた。特に、11人中7人の血清中には、28kDaのバンドと結合する物質が存在することが確認された。この28kDaのバンドを有する7人中5人は難治性の潰瘍性大腸炎と診断されている患者であった（図1参照）。

【0051】

他方、間接蛍光抗体法（IIF）でANCAが検出されなかった（ANCA陰性の）潰瘍性大腸炎患者血清からは、28kDaと結合する抗体は検出されなかった。また、対照としたクローン病患者血清では28kDaと結合する抗体は検出されなかった。

【0052】

この結果をまとめると、潰瘍性大腸炎患者35人中24人はIIFでANCA陽性であり

、ウェスタンブロッティングでは35人中11人にANCAと結合する抗原が存在することが確認された（この11人はすべてIIFでANCA陽性であった）。また35人中の難治性潰瘍性大腸炎患者は7人存在し、この7人中6人にANCAと結合する抗原がウェスタンブロッティングで検出され、6人中5人に28kDaのバンドが認められた。なお対照としたクローン病患者血清では陽性バンドは認められなかった（図1参照）。

【0053】

これらの実験結果は、好中球28kDa抗原に対する抗体の出現が、潰瘍性大腸炎の重症度（難治度）を予見させるマーカーになりうることを示唆し、その抗原の単離解析と、単離抗原を用いた簡便な抗体の検出系の開発の重要性を示すものである。

【0054】

（実施例4） HL-60細胞に28kDaおよび29kDa抗原が存在することの確認

前骨髄性白血病由来の好中球細胞であるHL-60細胞株を、5%FCSを添加したRPMI1640培地で培養し、実施例3に記載の方法で、好中球ライセートを作製した。このライセートを用いて、実施例3と同様にウェスタンブロッティングを行った。好中球ライセートを用いたポジティブコントロールとともに、結果を図2に示す。これより潰瘍性大腸炎患者から得られた抗体画分と結合する28kDa抗原と29kDa抗原が存在することが確認された。

【0055】

（実施例5） HL-60細胞からの28kDaおよび29kDa抗原の精製

実施例4で抗原の存在が確認されたHL-60細胞株を5%FCSを添加したRPMI1640培地で培養した。1×10⁵個の細胞が、2×10⁶個の細胞数となったところで遠心分離により回収した。2×10⁸個の細胞に6M塩酸グアニジン10mlを加えて溶解し、超音波処理（島津社製USP600）を1分間行った。この操作で、細胞は完全に溶解した。この溶液と同量の蒸留水を加えて2倍に希釈した後、80000 × g、30分遠心分離して上清を回収した、この上清を分子量3000以下を除去する膜YM3（アミコン社製）を装着したアミコン限外濾過器（アミコン社製）に移し、PBSを加えながら濾過を行い、最終的に4mlのPBS溶液とした。このPBS溶液を80000 ×

g、30分遠心分離して沈殿を除去し、上清を回収した。回収した上清を抗原含有サンプルとし、このサンプルからHPLCを用いて28kDaおよび29kDa画分を分画した。YMC-パックプロテインRPカラム（ワイエムシー社製）を用い、アセトニトリル濃度16%から48%の濃度勾配により蛋白質を溶出した。結果を図3に示す。図3のNo. 9のピークを回収し、凍結乾燥を行った。凍結乾燥したサンプルをPBSに再溶解し、再びYMC-パックプロテインRPカラムを用いて、アセトニトリル濃度24%から36%の濃度勾配により蛋白質を溶出した。HPLCシステムは島津社製LC-7Aシステムを用いて行った。結果を図4に示す。No. 5およびNo. 6のピークを回収し遠心濃縮乾燥を行った。遠心濃縮乾燥されたサンプルをSDS-PAGEで泳動し、ウェスタンブロッティングによりPVDF膜（アマシャム社製）に転写し、ポンソウスを用いて染色後、28kDaおよび29kDaのバンドを切り抜き、回収した。結果を図5に示す。精製した抗原のSDS-PAGEでは、2種の蛋白質は分離し識別可能となった。

【0056】

（実施例6） 部分アミノ酸配列の決定およびホモロジー解析

実施例5で回収された28kDaおよび29kDaのバンドを含む膜を乾燥後、アミノ酸配列の決定に用いた。アミノ酸配列の決定は、島津社製の全自動蛋白質一次構造分析装置PPSQ-10システムを用いて行った。その結果、28kDaのバンドはN-末端の32個の部分アミノ酸配列が決定された。配列は以下の通りであった。

【0057】

Gly Lys Gly Asp Pro Asn Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe
Val Gln Thr Xaa Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp（配列番号11）

同様にして、29kDaのバンドのアミノ酸配列を解析したところ、N末端より32個のアミノ酸配列が決定された。配列は以下の通りであった。

【0058】

Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe
Val Gln Thr Xaa Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp（配列番号12）

（実施例7） 部分アミノ酸配列のホモロジー解析

実施例6で得られたアミノ酸配列についてホモロジー解析を行った。Altschul, S. F. らのBLASTプログラム（J. Mol. Biol. vol. 205: 403-410）を用いて、

既知データベースPIRに含まれる全てのアミノ酸配列に対するホモロジーサーチを行った結果、29kDaの抗原はノンヒストン核蛋白質HMG-1(Reeck, G. R. Nucleic Acids Res. 1989, vol. 17: 1197-1214)と32アミノ酸中31個が一致した。また、28kDaの抗原はHMG-2(Majumdar, A. Nucleic Acids Res. 1991, vol 19: 6643)と32アミノ酸中31個が一致した。両抗原とも22番目のシステインが同定できなかった。システインはチオール基を修飾しないと検出できないことから、逆に22番目はシステインと考えられ、SDS-PAGEによる分子量をも考慮に入れて28kDaおよび29kDa抗原は、それぞれHMG-2、HMG-1と同定された。

【0059】

(実施例8) ウェスタンブロッティングによる、UC患者血清中の抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体の検出

ウシHMG-1およびHMG-2混合物(和光純薬社より販売)を抗原としてウェスタンブロッティングを行った。ウシHMG-1(0.5 μ g)およびHMG-2(0.5 μ g)混合物をサンプルバッファー(実施例3)に溶解し、常法に従って熱処理後SDS-PAGEを行った。SDS-PAGE終了後、PVDF膜に転写し、UC患者血清、HRP標識抗ヒトIgG抗体の順で反応させ、ECLにより検出を行った。結果を図6に示した。これらの結果より、UC患者血清中には抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体が存在することが示された。

【0060】

(実施例9) ELISA法による抗HMG-1抗体および抗HMG-2抗体の測定

96ウェルのELISA用プレート(Nunc社製)の各ウェルに5 μ g/mlのウシHMG-1およびHMG-2を50 μ lずつ添加し、4℃で24-36時間静置した。過剰の抗原を除去後、5%BSA200 μ lを加え30分以上静置しブロッキングを行った。5%BSAで40倍あるいは80倍希釈した患者血清を50 μ l加え2時間室温で静置した。0.05%Tween/0.02%azide/PBS(洗浄液)で5回洗浄後、1000倍希釈のアルカリフォスファターゼ標識したヤギ抗ヒトIgG(F(ab')₂)(フナコシより販売)を100 μ l加え、室温で2時間反応させた。洗浄液で5回洗浄後、0.1%のp-nitrophenyl phosphate、disodium (pNPP)(Sigma社製)溶液(10%ジエタノールアミン溶液)を100 μ l加え、室温で20-25分反応させ、405nmの吸光度を測定した。

【0061】

図7に陽性コントロールの検量線を示した。この検量線から、ウシHMG-1およびHMG-2を用いたELISA法により抗HMG-1抗体および／又は抗HMG-2抗体が測定できることがわかった。さらに潰瘍性大腸炎患者68人の血清を測定した結果、20人(29.4%)が陽性であり、健常人7.1%(4/20人)に比べ有意に高い陽性率を示した。尚、健常人コントロールのmean+3SD以上を陽性とした。また、潰瘍性大腸炎患者の内、難治性患者では7人中5人が陽性(71.4%)と高い陽性率を示した。

【0062】

【発明の効果】

潰瘍性大腸炎での抗好中球細胞質抗体(ANCA)の対応抗原HMG-1およびHMG-2を特定できたことにより、当該抗原を用いた簡便な抗体の検出が可能となった。

さらには、ANCAの対応抗原としてHMG-1およびHMG-2が同定されたことより、これらに対する抗体は潰瘍性大腸炎以外のANCA陽性疾患にも検出される可能性がある。また、間接蛍光抗体法よりELISAの方が感度的に優れているため、今までANCA陰性あるいは陽性率の低いと考えられていた疾患においてもHMG-1およびHMG-2が対応抗原となっている可能性がある。可能性のある疾患とは、自己免疫疾患および炎症性疾患が考えられる。具体的には、潰瘍性大腸炎以外では、クローン病、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、自己免疫性肝炎、B型肝炎、C型肝炎、ウェゲネナー肉芽腫症、白血球破壊性血管炎、半月体形成性腎炎、pauci-immune型壊死性半月体形成性腎炎(急速進行性腎炎)、顕微鏡的多発性動脈炎、Churg-Strauss症候群、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、ベーチェット病、多発性筋炎、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、進行性全身性硬化症(強皮症)、混合性結合組織病である。

【0063】

【配列表】

配列番号 1

配列の長さ: 214

配列の型: アミノ酸

配列の種類: ペプチド

配列の特徴 : HMG-1

起源 : ヒト

配列

Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe
5 10 15
Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn
20 25 30 35
Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys
40 45 50
Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg
55 60 65 70
Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp
75 80 85 90
Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr
95 100 105
Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys
110 115 120 125
Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu
130 135 140
Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg
145 150 155 160
Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser
165 170 175 180
Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu
185 190 195
Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
200 205 210

【 0 0 6 4 】

配列番号 : 2

配列の長さ : 208

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド

配列の特徴 : HMG-2

起源 : ヒト

配列

Gly	Lys	Gly	Asp	Pro	Asn	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Met	Ser	Ser	Tyr	Ala	Phe	Phe	5	10	15	
Val	Gln	Thr	Cys	Arg	Glu	Glu	His	Lys	Lys	Lys	His	Pro	Asp	Ser	Ser	Val	Asn	20	25	30	35
Phe	Ala	Glu	Phe	Ser	Lys	Lys	Cys	Ser	Glu	Arg	Trp	Lys	Thr	Met	Ser	Ala	Lys	40	45	50	
Glu	Lys	Ser	Lys	Phe	Glu	Asp	Met	Ala	Lys	Ser	Asp	Lys	Ala	Arg	Tyr	Asp	Arg	55	60	65	70
Glu	Met	Lys	Asn	Tyr	Val	Pro	Pro	Lys	Gly	Asp	Lys	Lys	Gly	Lys	Lys	Lys	Asp	75	80	85	90
Pro	Asn	Ala	Pro	Lys	Arg	Pro	Pro	Ser	Ala	Phe	Phe	Leu	Phe	Cys	Ser	Glu	His	95	100	105	
Arg	Pro	Lys	Ile	Lys	Ser	Glu	His	Pro	Gly	Leu	Ser	Ile	Gly	Asp	Thr	Ala	Lys	110	115	120	125
Lys	Leu	Gly	Glu	Met	Trp	Ser	Glu	Gln	Ser	Ala	Lys	Asp	Lys	Gln	Pro	Tyr	Glu	130	135	140	
Gln	Lys	Ala	Ala	Lys	Leu	Lys	Glu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Ile	Ala	Ala	Tyr	Arg	145	150	155	160
Ala	Lys	Gly	Lys	Ser	Glu	Ala	Gly	Lys	Lys	Gly	Pro	Gly	Arg	Pro	Thr	Gly	Ser	165	170	175	180
Lys	Lys	Lys	Asn	Glu	Pro	Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Glu	185	190	195	
Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Glu	Asp	Glu	Glu												

205

【 0 0 6 5 】

配列番号 3

配列の長さ：214

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：HMG-1

起源：ウシ

配列

Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe

15

Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn

35

Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys

50

Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg

70

Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp

90

Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr

105

Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys

125

Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu

140

Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg

160

Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser

180

Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu

185

190

195

Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu

200

205

210

【0066】

配列番号：4

配列の長さ：214

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：HMG-1

起源：ブタ

配列

Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe

5

10

15

Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn

20

25

30

35

Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys

40

45

50

Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg

55

60

65

70

Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp

75

80

85

90

Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr

95

100

105

Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys

110

115

120

125

Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys His Pro Tyr Glu

130

135

140

Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg

145 150 155 160
 Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser
 165 170 175 180
 Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu
 185 190 195
 Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
 200 205 210

【0067】

配列番号 : 5

配列の長さ : 214

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド

配列の特徴 : HMG-1

起源 : ラット

配列

Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe
 5 10 15
 Val Glu Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn
 20 25 30 35
 Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys
 40 45 50
 Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg
 55 60 65 70
 Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp
 75 80 85 90
 Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr
 95 100 105
 Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys
 110 115 120 125

Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys His Pro Tyr Glu
 130 135 140
 Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg
 145 150 155 160
 Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val Lys Ala Glu Lys Ser
 165 170 175 180
 Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Asp Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu
 185 190 195
 Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
 200 205 210

【0068】

配列番号 6

配列の長さ : 209

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド

配列の特徴 : HMG-2

起源 : ブタ

配列

Gly Lys Gly Asp Pro Asn Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe
 5 10 15
 Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ser Ser Val Asn
 20 25 30 35
 Phe Ala Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys
 40 45 50
 Glu Lys Ser Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ser Asp Lys Ala Arg Tyr Asp Arg
 55 60 65 70
 Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro Pro Lys Gly Asp Lys Lys Gly Lys Lys Lys Asp
 75 80 85 90
 Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu His

	95	100	105
Arg Pro Lys Ile Lys Ser Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys			
110	115	120	125
Lys Leu Gly Glu Met Trp Ser Glu Gln Ser Ala Lys Asp Lys Gln Pro Tyr Glu			
130	135	140	
Gln Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg			
145	150	155	160
Ala Lys Gly Lys Gly Glu Ala Gly Lys Lys Gly Pro Gly Arg Pro Thr Gly Ser			
165	170	175	180
Lys Lys Lys Asn Glu Pro Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp			
185	190	195	
Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu			
200	205		

【0069】

配列番号：7

配列の長さ：186

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：HMG-2の部分配列

起源：ウシ

配列

Gly Lys Gly Asp Pro Asn Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe			
5	10	15	
Val Gln Thr Ser Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn			
20	25	30	35
Phe Ser Glu/Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Ser Lys Phe Glu Asp			
40	45	50	
Met Ala Lys Ser Asp Lys Ala Arg Tyr Asp Arg Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro			
55	60	65	70

Pro Lys Gly Asp Lys Lys Gly Lys Lys Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro
75 80 85 90
Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Ser Ala Glu His Arg Pro Lys Ile Lys Ala Glu
95 100 105
His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Ser
110 115 120 125
Gln Gln Ser Ala Lys Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Gln Lys Ala Ser Lys Leu Lys
130 135 140
Glu Lys Tyr Glu Lys Xaa Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Ser Glu Ala Gly
145 150 155 160
Lys Lys Gly Pro Gly Arg Pro Thr Gly Ser Lys Lys Lys Asn Glu Pro Glu Asp
165 170 175 180
Glu Glu Glu Glu Glu Glu
185

【0070】

配列番号：8

配列の長さ：206

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：HMG-2

起源：チキン

配列

Gly Lys Gly Asp Pro Asn Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Tyr Phe
5 10 15
Val Gln Thr Cys Pro Arg Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ser Ser Val Asn
20 25 30 35
Phe Ala Glu Phe Ser Arg Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys
40 45 50
Glu Lys Gly Lys Phe Glu Glu Met Ala Lys Gly Asp Lys Ala Arg Tyr Asp Arg

55	60	65	70
Glu Met Lys Asn Tyr Val	Pro Pro Lys Gly Glu Lys Lys Gly Lys Lys Lys Asp		
75	80	85	90
Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu His			
95	100	105	
Arg Pro Lys Ile Lys Asn Asp His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys			
110	115	120	125
Lys Leu Gly Glu Met Trp Ser Glu Gln Ser Ala Lys Asp Lys Gln Pro Tyr Glu			
130	135	140	
Gln Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg			
145	150	155	160
Ala Lys Ser Lys Ser Asp Ala Gly Lys Lys Gly Pro Gly Arg Pro Ala Gly Ser			
165	170	175	180
Lys Lys Lys Ala Glu Pro Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu			
185	190	195	
Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu			
200	205		

【0071】

配列番号 9

配列の長さ : 201

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド

配列の特徴 : HMG-2a

起源 : チキン

Ala Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Lys Gly Lys Met Ser Ala Tyr Ala Phe Phe			
5	10	15	
Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys Asn Pro Glu Val Pro Val Asn			
20	25	30	35
Phe Ala Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys			

40	45	50
Glu Lys Ala Lys Phe Asp Glu Met Ala Lys Ala Asp Lys Val Arg Tyr Asp Arg		
55	60	65
Glu Met Lys Asp Tyr Gly Pro Ala Lys Gly Gly Lys Lys Lys Lys Asp Pro Asn		
75	80	85
Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Gly Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Phe Arg Pro		
95	100	105
Lys Ile Lys Ser Thr Asn Pro Gly Ile Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu		
110	115	120
Gly Glu Met Trp Asn Asn Leu Ser Asp Gly Glu Lys Gln Pro Tyr Asn Asn Lys		
130	135	140
Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Val Ala Asp Tyr Lys Ser Lys		
145	150	155
Gly Lys Phe Asp Gly Ala Lys Gly Ala Ala Thr Lys Ala Ala Arg Lys Lys Val		
165	170	175
Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Asp Glu Asp Asp		
185	190	195
Asp Asp Glu		
200		

【0072】

配列番号 10

配列の長さ : 208

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド

起源 : マウス

配列の特徴 : HMG-2

Gly Lys Gly Asp Pro Ile Lys Pro Leu Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe
5 10 15
Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asn Ser Ser Val Asn

20	25	30	35
Phe Ala Glu Ile Ser Lys Lys Cys Ser Lys Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys			
40	45	50	
Glu Asn Ser Lys Phe Glu Asp Leu Ala Lys Ser Asp Lys Ala Cys Tyr Tyr Arg			
55	60	65	70
Glu Met Lys Asn Tyr Val Ser Pro Lys Gly Asp Lys Lys Gly Lys Lys Lys Asp			
75	80	85	90
Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Cys Leu Phe Cys Ser Glu Asn			
95	100	105	
Arg Pro Lys Ile Lys Ile Glu Tyr Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys			
110	115	120	125
Lys Leu Gly Glu Met Trp Ser Glu Gln Ser Ala Lys Glu Lys Gln Pro Tyr Glu			
130	135	140	
Gln Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Phe Ala Ala Tyr Arg			
145	150	155	160
Val Lys Gly Lys Ser Glu Ala Gly Lys Lys Gly Pro Gly Arg Pro Ala Gly Ser			
165	170	175	180
Lys Lys Lys Asn Asp Ser Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu			
185	190	195	
Asp Glu Glu Gly Glu Glu Glu Asp Glu Glu			
200	205		

【007.3】

配列番号 11

配列の長さ : 32

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 28KDaN 末端フラグメント

起源

細胞の種類 : 前骨髄性白血病由来の好中球細胞

セルライン：HL-60細胞株(ATCC CCL-240)

配列の特徴

配列を決定した方法：E

配列

Gly	Lys	Gly	Asp	Pro	Asn	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Met	Ser	Ser	Tyr	Ala	Phe	Phe
				5					10						15		
Val	Gln	Thr	Xaa	Arg	Glu	Glu	His	Lys	Lys	Lys	His	Pro	Asp				
				20				25					30				

【0074】

配列番号 1 2

配列の長さ：32

配列の型：アミノ酸

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：29KDaN末端フラグメント

起源

細胞の種類：前骨髄性白血病由来の好中球細胞

セルライン：HL-60細胞株(ATCC CCL-240)

配列の特徴

配列を決定した方法：E

Gly	Lys	Gly	Asp	Pro	Lys	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Met	Ser	Ser	Tyr	Ala	Phe	Phe
				5					10						15		
Val	Gln	Thr	Xaa	Arg	Glu	Glu	His	Lys	Lys	Lys	His	Pro	Asp				
				20				25					30				

【図面の簡単な説明】

【図1】

健常人末梢血から分離した好中球細胞質ライセート（抗原）をSDS-PAGEで泳動後、潰瘍性大腸炎患者5人の患者血清と健常人3人の血清から得られた精製IgG（抗体）を用いたウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

【図 2】

好中球とHL-60の細胞ライセートを抗原とし、28kDa抗原陽性患者の血清をプローブとしたウェスタンブロッティングのパターンを示す図である。

【図 3】

HPLCのパターンを示す図である。No. 9 のピークに28kDa抗原および29kDa抗原が含まれる。

【図 4】

HPLCのパターンを示す図である。No. 5 のピークに28kDa抗原がNo. 6 のピークに29kDa抗原が含まれる。

【図 5】

No. 5 (28kDa)およびNo. 6 (29kDa)のピークのウェスタンブロッティングのパターンを示してある。この28kDaおよび29kDaのバンドを回収しアミノ酸配列の解析を示す図である。

【図 6】

潰瘍性大腸炎患者 5 人のウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

【図 7】

陽性患者の血清を用いて、ELISA法により測定した用量依存曲線を示す図である。

【図 8】

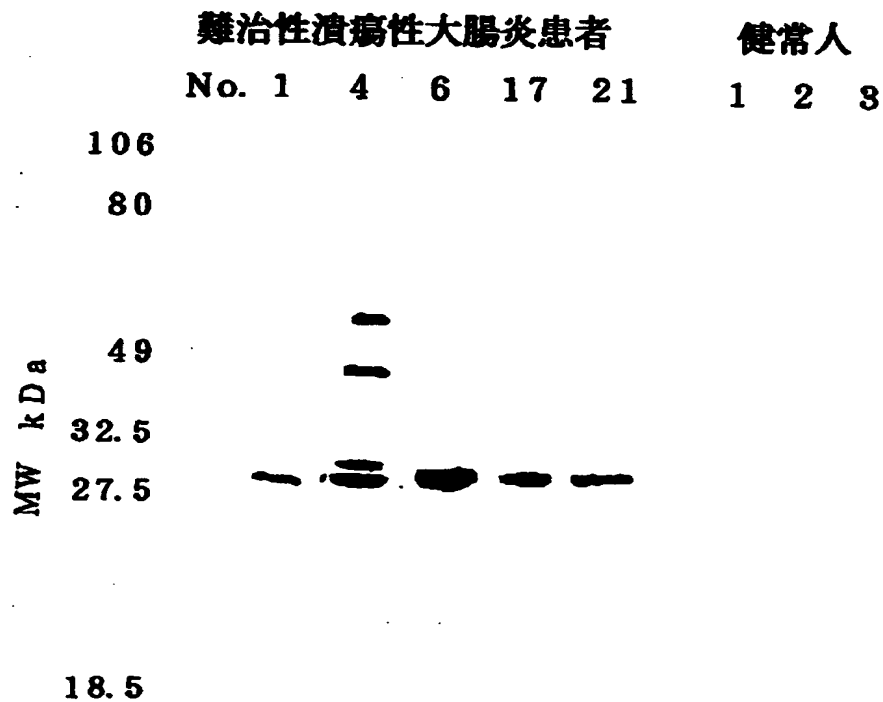
ヒト、ブタ、ウシおよびラットHMG-1のアミノ酸配列を比較した図である。

【図 9】

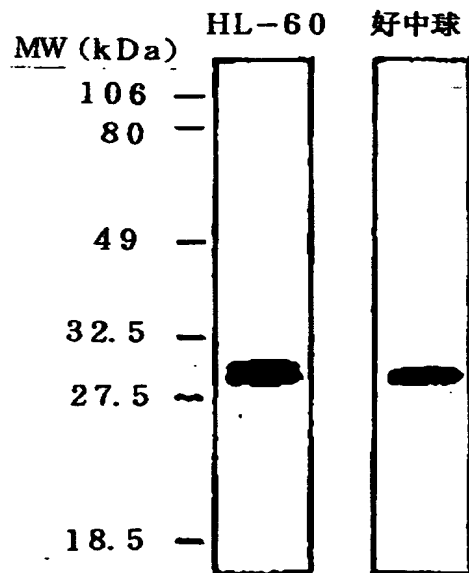
ヒト、ブタ、ウシおよびマウスHMG-2のアミノ酸配列を比較した図である。

【書類名】 図面

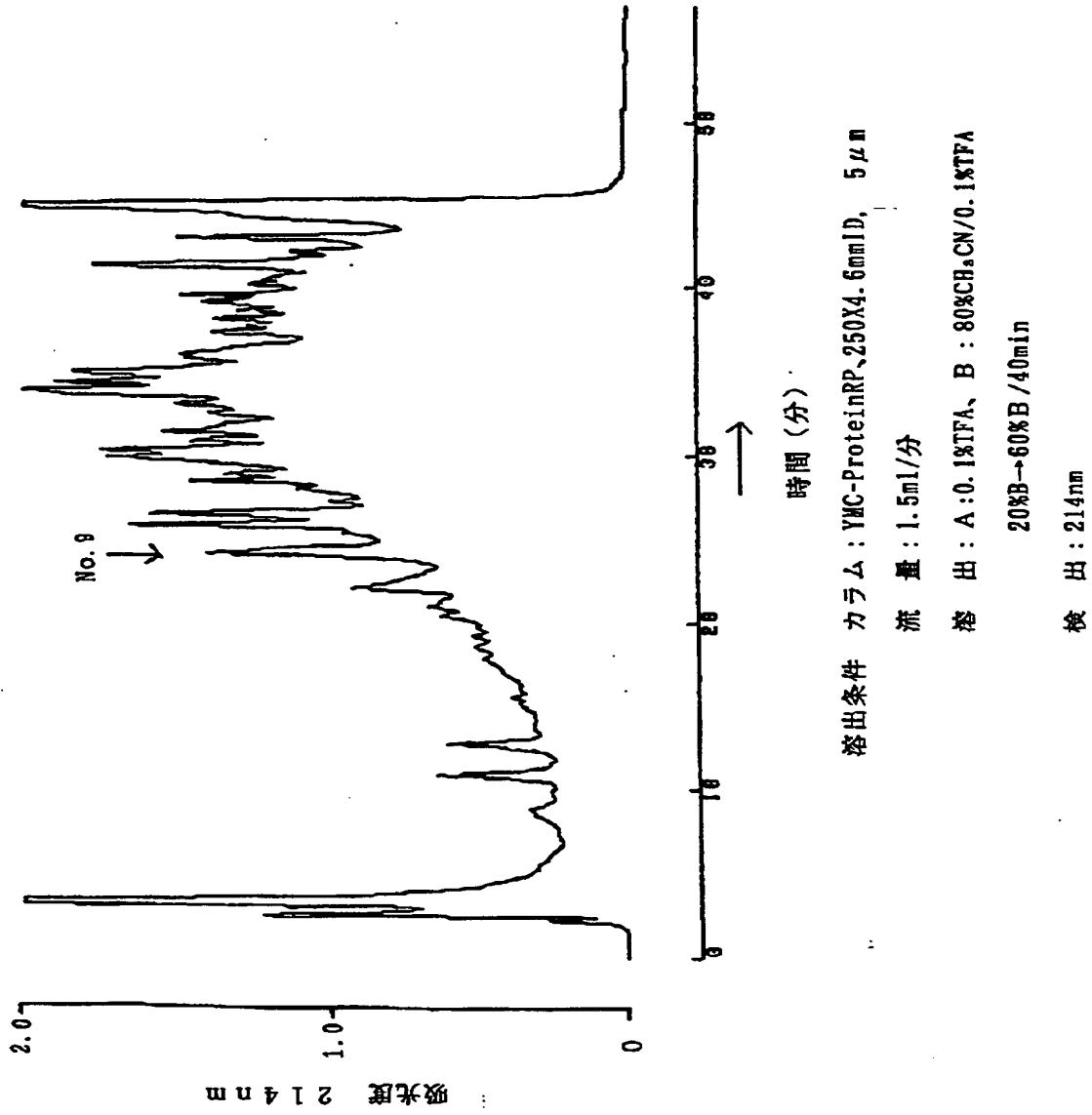
【図 1】



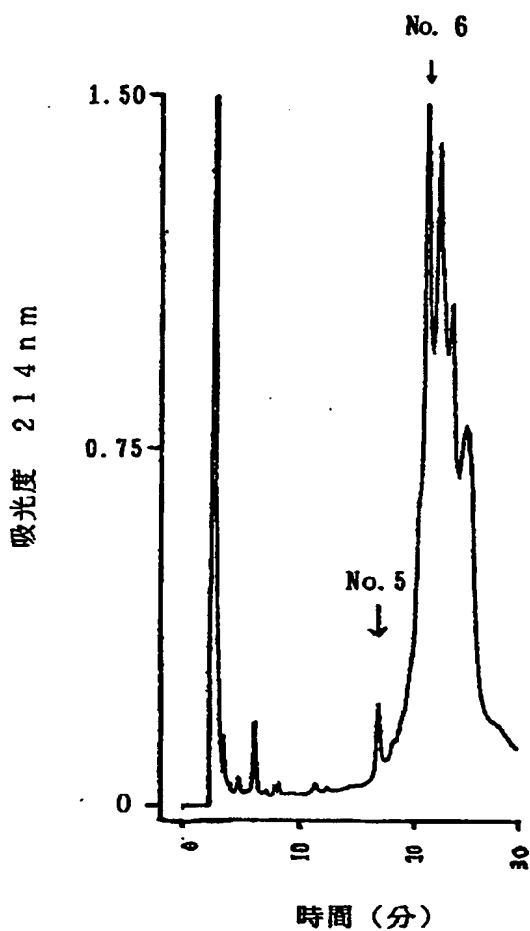
【図 2】



【図3】



【図4】



溶出条件 カラム : YMC-ProteinRP、250X4.6mmID, 5 μ m

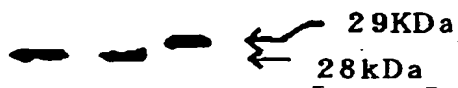
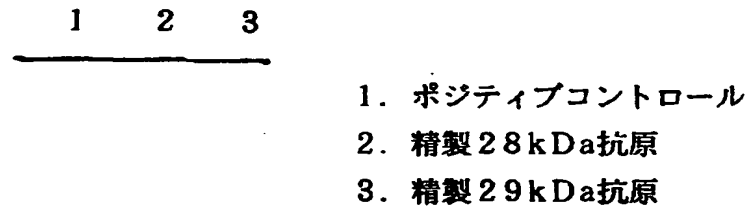
流 量 : 1.5ml/分

溶 出 : A : 0.1%TFA、B : 80%CH₃CN/0.1%TFA

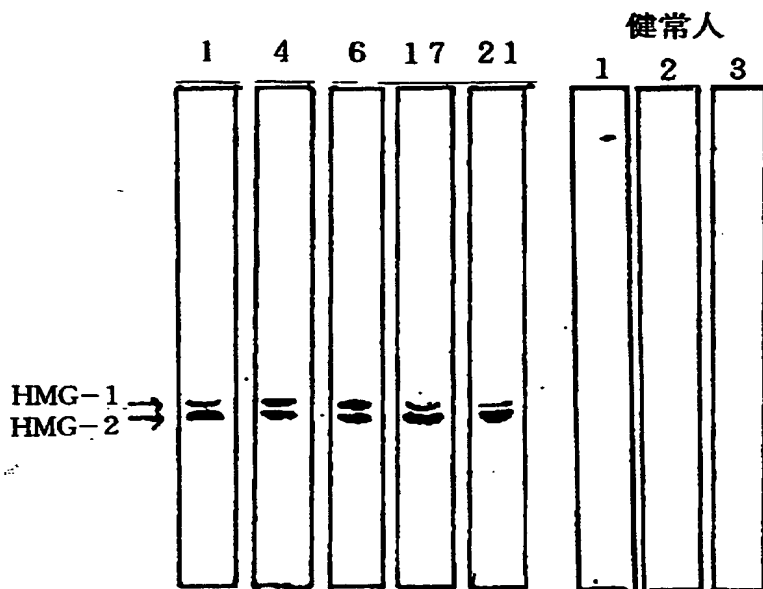
30%B→45%B / 30min

検 出 : 214nm

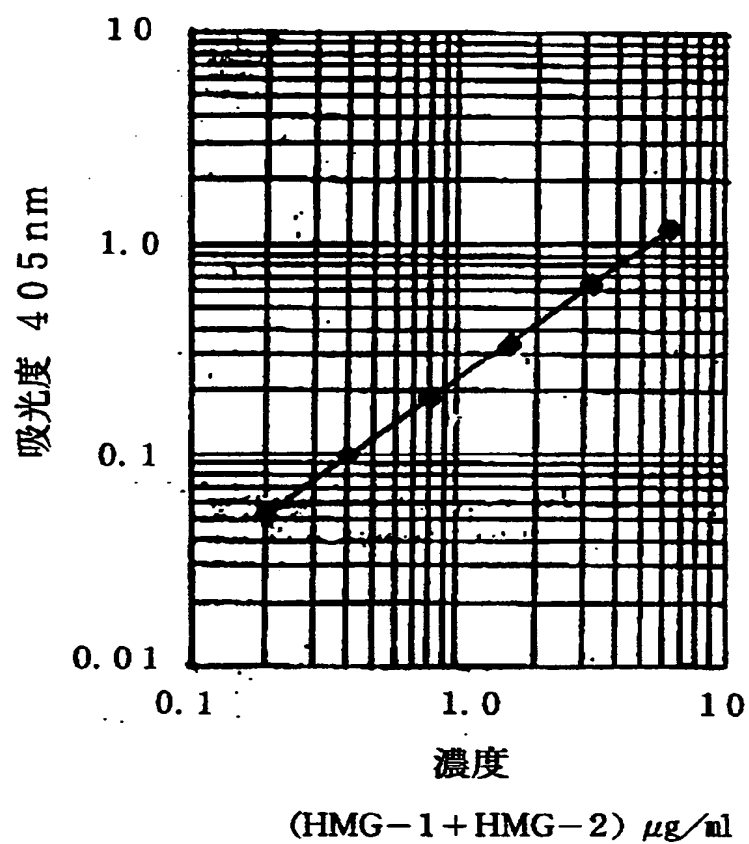
【図5】



【図6】



【図7】



【図 8】

ヒト、ブタ、ウシ、およびラットHMG-1のアミノ酸配列の比較

ヒトと比較して同一アミノ酸を縦棒で示してある。

ヒト	1	OKGDPKKPRGKNSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERVKT	50
ブタ	1	GKGDPKKPRGKNSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERVKT	50
ウシ	1	GKGDPKKPRGKNSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERVKT	50
ラット	1	GKGDPKKPRGKNSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERVKT	50
ヒト	51	MSAKEKGKGFEDNAKADKARYERENKTYIPPKGETKKKFKDPNAPKRPPSA	100
ブタ	51	MSAKEKGKGFEDNAKADKARYERENKTYIPPKGETKKKFKDPNAPKRPPSA	100
ウシ	51	MSAKEKGKGFEDNAKADKARYERENKTYIPPKGETKKKFKDPNAPKRPPSA	100
ラット	51	MSAKEKGKGFEDNAKADKARYERENKTYIPPKGETKKKFKDPNAPKRPPSA	100
ヒト	101	FFLFCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGENVNNTAADDKQPYEKKAACL	150
ブタ	101	FFLFCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGENVNNTAADDKHPYEKKAACL	150
ウシ	101	FFLFCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGENVNNTAADDKQPYEKKAACL	150
ラット	101	FFLFCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGENVNNTAADDKQPYEKKAACL	150
ヒト	151	KEKYEKDIAAYRAKGPDAAKKGVVKAESKKKKKEEEDDEEEDDEEEDDEE 200	
ブタ	151	KEKYEKDIAAYRAKGPDAAKKGVVKAESKKKKKEEEDDEEEDDEEEDDEE 200	
ウシ	151	KEKYEKDIAAYRAKGPDAAKKGVVKAESKKKKKEEEDDEEEDDEEEDDEE 200	
ラット	151	KEKYEKDIAAYRAKGPDAAKKGVVKAESKKKKKEEEDDEEEDDEEEDDEE 200	
ヒト	201	DEEDEDEEEDDDDE	214
ブタ	201	DEEDEDEEEDDDDE	214
ウシ	201	DEEDEDEEEDDDDE	214
ラット	201	EEEDEDEEEDDDDE	214

【図9】

ヒト、ブタ、ウシ、およびマウスHMG-2のアミノ酸配列の比較
ヒトと比較して同一アミノ酸を縦棒で示してある。

ヒト	1	GKGDPNKPRGKNSSYAFFVQTCREEHKKKHPDSSVNFAEFSKKCSERVKT	50
ブタ	1	GKGDPNKPRGKNSSYAFFVQTCREEHKKKHPDSSVNFAEFSKKCSERVKT	50
ウシ	1	GKGDPNKPRGKNSSYAFFVQTSREEHKKKHPDASVNF---S---ERVKT	50
マウス	1	GKGDPIKPLGKNSSYAFFVQTCREEHKKKHPNSSVNFAEISKKCSKRVKT	50
ヒト	51	MSAKEKSKFEDMAKSDKARYDRENKNYVPPKGDKKKKDPNAPKRPPSA	100
ブタ	51	MSAKEKSKFEDMAKSDKARYDRENKNYVPPKGDKKKKDPNAPKRPPSA	100
ウシ	51	MSAKEKSKFEDMAKSDKARYDRENKNYVPPKGDKKKKDPNAPKRPPSA	100
マウス	51	MSAKENSKFEDLAKSDKACYRENKNYVSPKGDKKKKDPNAPKRPPSA	100
ヒト	101	FFLFCSEHRPKIKSEHPGLSIGDTAKKLGENVSESAKDKQPYEQKAAKL	150
ブタ	101	FFLFCSEHRPKIKSEHPGLSIGDTAKKLGENVSESAKDKQPYEQKAAKL	150
ウシ	101	FFLFSAEHRPKIKAHPGLSIGDTAKKLGENVSQSAKDKQPYEQKASKL	150
マウス	101	FCLFCSENRPKIKIEYPGLSIGDTAKKLGENVSESAKDKQPYEQKAAKL	150
ヒト	151	KEYEKDIAAYRAKKGSEAGKKGPRPTGSKKKNPEDEEEEEEE-DED	199
ブタ	151	KEYEKDIAAYRAKKGSEAGKKGPRPTGSKKKNPEDEEEEEEEDEDED	200
ウシ	151	KEYEKX-AAAYRAKKGSEAGKKGPRPTGSKKKNPEDEEEEEEE.....	200
マウス	151	KEYEKDFAAYRYKKGSEAGKKGPRPACSKKINDSEDEEEEEEE-EDD	199
ヒト	200	EEEEDEDEE	208
ブタ	201	EEEEDEDEE	209
ウシ	201	
マウス	201	EEGEEEEDEE	208

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 自己免疫疾患および／または炎症性疾患患者を特異的に検出すること

【解決手段】 HMG-1ファミリーから選ばれるポリペプチド、HMG-2ファミリーから選ばれるポリペプチド、あるいはそれらの断片であって自己免疫疾患および／または炎症性疾患患者の抗体と反応し得る断片の少なくとも一種を含有する診断薬、診断キット、およびこれらを用いて自己免疫疾患および／または炎症性疾患の抗体を検出し得る。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 000000941
【住所又は居所】 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号
【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社
【代理人】 申請人
【識別番号】 100078282
【住所又は居所】 大阪市中央区城見1丁目2番27号 クリスタルタ
ワー15階
【氏名又は名称】 山本 秀策

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000941]

1. 変更年月日	1990年 8月27日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号
氏 名	鐘淵化学工業株式会社